

Publication number: JP4304887

Publication date: 1992-10-28

Inventor: KATO AKIO; KOBAYASHI KUNIHICO;  
NAKAMURA SOICHIRO

Applicant: NAKANO VINEGAR CO LTD

[Abstract]

CONSTITUTION: This invention discloses the lysozyme - guar gum enzymatic hydrolysate complex wherein a lysozyme is bound to a guar gum enzymatic hydrolysate by aminocarbonyl reaction and production method thereof.

EFFECT: The subject complex has excellent emulsifiability and antimicrobial properties, so it is useful as a polymeric emulsifying agent and an antimicrobial agent for foods, medicines, cosmetics, etc.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-304887

(43) 公開日 平成4年(1992)10月28日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/36		7823-4B		
// A 6 1 K 37/54	A D Z	8314-4C		

審査請求 未請求 請求項の数 8 (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願平3-133797

(22) 出願日 平成3年(1991)3月29日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成3年3月15日  
社団法人日本農芸化学会発行の「日本農芸化学会1991年  
度大会講演要旨集」に発表

(71) 出願人 390022644

株式会社中埜酢店  
愛知県半田市中村町2丁目6番地

(72) 発明者 加藤 昭夫

山口県山口市木町4-1

(72) 発明者 小林 邦彦

山口県山口市大字平井1057-5

(72) 発明者 中村 宗一郎

山口県宇部市東文京台646-9

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

(54) 【発明の名称】 リゾチーム・グアーガム酵素加水分解物複合体及び その製造法

(57) 【要約】

【構成】 本発明はリゾチームとグアーガム酵素加水分解物をアミノカルボニル反応によって結合させてなる新規なリゾチーム・グアーガム酵素加水分解物複合体及びその製造法。

【効果】 本発明の複合体は優れた乳化性と抗菌性を有することから、高分子系の乳化剤及び抗菌剤として、食品、医薬品、化粧品等の分野において有用である。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 リゾチームとグアーガム酵素加水分解物とをアミノカルボニル反応によって結合させてなるリゾチーム・グアーガム酵素加水分解物複合体。

【請求項2】 グアーガムの加水分解に用いる酵素がガラクトマンナーゼ及び／又はセルラーゼであることを特徴とする請求項1記載の複合体。

【請求項3】 グアーガム酵素加水分解物が分子量約12000～14000の画分を少なくとも60%以上含有するものであることを特徴とする請求項1又は2記載の複合体。

【請求項4】 乳化活性を有する請求項1乃至3記載の複合体。

【請求項5】 抗菌活性を有する請求項1乃至3記載の複合体。

【請求項6】 リゾチームとグアーガム酵素加水分解物とをアミノカルボニル反応によって結合させることを特徴とするリゾチーム・グアーガム酵素加水分解物複合体の製造法。

【請求項7】 リゾチームとグアーガム酵素加水分解物とを重量比で1:2乃至2:1の割合で反応させることを特徴とする請求項6記載の複合体の製造法。

【請求項8】 アミノカルボニル反応を相対湿度60～80%の雰囲気中温度50～80℃で1～6週間行なうことを特徴とする請求項6又は7記載の複合体の製造法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はリゾチームとグアーガム酵素加水分解物とをアミノカルボニル反応によって結合させてなるリゾチーム・グアーガム酵素加水分解物複合体及びその製造法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 従来、蛋白質に化学修飾(J. Agric. Food Chem., 33, 125 (1985))や酵素修飾(Agric. Biol. Chem., 50, 3025 (1986))を施したり、加熱等により蛋白質を変性させたり(Agric. Biol. Chem., 45, 2775 (1981))することによって、蛋白質の機能性を改善しようとする研究が数多くなされてきた。

【0003】 しかしながら、従来の化学修飾すなわち蛋白質のアシル化、アルキル化、アミド化、脱アミド化、エステル化等の処理及び蛋白質に炭水化物や脂肪酸を結合させる処理においては薬剤を用いるため、安全性の面からこれらの化学修飾により得られた蛋白質を食品原料として使用するには問題があった。また、一般に蛋白質は乳化活性を有するが、加熱等の処理による変性に伴って不溶化がおこり、乳化剤等に用いる場合、品質上の欠陥が生じる。本発明者らはこれまで行なわれてきた化学

2

修飾・酵素修飾の大部分が低分子物質を結合させる試みであったという現状を踏まえ、また現在、一般的によく用いられているショ糖-脂肪酸エステル等の低分子系乳化剤がpHや塩濃度の影響を受けやすいという欠点を有していたことから、優れた高分子系乳化剤を得るべく多糖類のような高分子物質を蛋白質に結合させるを試み、その結果活性化した分枝状多糖類を結合させることによって水溶性でかつ乳化特性に優れた機能性蛋白質が得られることを発見した。(特開平1-233300; J. Agric. Food Chem. 36, 421 (1988); Agric. Biol. Chem. 53, 2147 (1989))しかしながら、この方法は分枝状多糖類を活性化することが必須であるため、活性化剤として臭化シアン、過ヨード酸ナトリウム、塩化シアヌル等の薬剤を用いており、先に述べた様に安全性の面で問題が残っていた。

【0004】 また、得られた機能性蛋白質は分子量分布が広く製品の規格基準をそろえにくいという欠点も有していた。本発明者らは上記問題点を解決すべくさらに研究を重ねた結果、薬剤による活性化処理を施さずにアミノカルボニル反応により形成された蛋白質・多糖類複合体が高い乳化活性を示し、またとりわけ蛋白質としてリゾチーム・多糖としてデキストランを用いるとグラム陰性菌に対する抗菌活性が発現することを先に見出した。(特願平2-3559号, Agric. Biol. Chem., 54, 3057-3059 (1990))

しかしながら、多糖としてデキストランを用いると価格的に高価であり、またリゾチームが本来有している溶菌活性がリゾチーム・デキストラン複合体では残存活性32%まで低下するという欠点を有していた。(ACS Symposium Series No. 448 Microemulsions and Emulsions in Foods (American Chemical Society, 1991))

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明者等は、前述の諸問題を解決すべくさらに鋭意研究を重ねた結果、多糖類としてデキストランより安価なグアーガム酵素加水分解物を用いてリゾチーム・グアーガム酵素加水分解物複合体を形成させた場合、リゾチーム本来の溶菌活性の阻害が少なく、乳化活性が高く、さらに静菌力をも含めた、リゾチームには無いグラム陰性菌に対する抗菌活性が発現することなどを見出し、本発明を完成するに至った。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明は、リゾチームとグアーガム酵素加水分解物とをアミノカルボニル反応によって結合させてなる新規なリゾチーム・グアーガム酵素加水分解物複合体及びその製造法に関するものである。本発明で利用するリゾチームは動植物いずれの起源

のものでもよく、その代表例としては、例えばニワトリ卵白、尿、パパイア、酵母等を起源とするものが挙げられる。

【0007】グアーガム酵素加水分解物としては、グアーガムに例えばガラクトマンナーゼ、セルラーゼ等の酵素を作用させて低粘度化したものが利用出来る。通常、このグアーガム酵素加水分解物は分解により生じた低分子の画分を除去するための透析処理を施して利用するのが望ましい。透析処理を施す場合は、グアーガム酵素加水分解物を水溶液としたものを例えば分子量1万程度の透析膜を用いて充分量の脱塩水に対して一晚攪拌しながら透析した後、凍結乾燥を行い粉末として次の反応に利用すればよい。

【0008】本発明に於けるアミノカルボニル反応は、例えば次のようにして行うことが出来る。即ち、リゾチームとグアーガム酵素加水分解物を重量比で1:2乃至2:1程度の割合で混合した混合粉末又は両者を混合水溶液とした後、凍結乾燥して得た粉末を反応温度50~80℃(好ましくは60℃)、相対湿度60~85%(好ましくは79%)の条件下で1~6週間反応させることにより本発明の複合体が形成される。

【0009】反応条件を50℃未満あるいは相対湿度60%未満にするとアミノカルボニル反応がおこりにくく、80℃を超える高温では褐変が急激におこるため、蛋白質の乳化活性や抗菌活性が低下する原因となる。ま\*

10

20

表 1

本発明複合体の 粗製物 No.	反 応 条 件		
	原料混合比	湿度(%)	反応時間(週)
1	1:1	85	1
2 (標品d)*	1:1	85	2
3	1:1	85	3
4 (標品a)	1:1	79	1
5 (標品b)*	1:1	79	2
6 (標品c)	1:1	79	3
7	2:1	85	1
8	2:1	85	2
9	2:1	85	3
10	2:1	79	1
11	2:1	79	2
12	2:1	79	3

\* 標品a, b, c, dはそれぞれNo. 4, 5, 6, 2の粗製物を後記実施例2の方法でゲル濾過精製したもので、本発明複合体の乳化活性、抗菌活性等の測定を行う際の試料として用いた。

【0014】なお、本実施例1の出発原料のグアーガム酵素加水分解物は市販の製品(商品名:サンファイバ

50

\*た相対湿度が85%を超えるとベタつきがおこり品質の安定性が望ましくない。1週間未満では反応が十分に進まず、また6週間を超えて反応させても複合体の乳化活性は向上しない。本発明の複合体は必要に応じてゲル濾過等によって精製して用いることができる。

【0010】こうして得られた本発明の複合体は水に可溶で乳化活性が高く、リゾチーム本来の溶菌活性の阻害が少なく、さらにリゾチーム単独では得られなかったグラム陰性菌に対する抗菌性を発揮する。

【0011】

【実施例】本発明の実施態様を詳細に説明するため以下に実施例を示すが、本発明は実施例のみに限定されるものではない。

【0012】

【実施例1】 本発明複合体の製造

卵白リゾチームとグアーガム酵素加水分解物を重量比1:1及び2:1の割合で混合して水溶液とした後、凍結乾燥した。得られた凍乾粉末をガラスシャーレに入れ、飽和ヨウ化カリウム溶液で約65%湿度及び飽和臭化カリウム溶液で約79%湿度に調整したデシケーター中で60℃で1~3週間保持して反応させ反応条件の異なる12種の本発明複合体の粗製物を得た。得られた各粗製物の反応条件は表1に示す通りである。

【0013】

【表1】

~14000の透析膜(三光純薬製)を用いて充分量の脱塩水に対して一晚攪拌しながら透析し、透析内液を凍結乾燥して得た粉末(回収率60%)を用いた。

【0015】

## 【実施例2】 本発明複合体の精製

実施例1で製造した前記12種の本発明複合体粗製物をそれぞれセファロースCL6Bを用いるゲル濾過により精製した。溶出は10mM NaClを含有する50mM酢酸緩衝液(pH5.0)を用いて流速は毎分1mlで行ない、3.0mlずつ分画し、活性画分を採取した。

【0016】本実施例の溶出パターンは各反応原料混合物の溶出パターンと共に図1に示した。図1において、実線は280nmにおける吸光度(蛋白質の吸収)を、破線はフェノール硫酸法で発色させた後の470nmにおける吸光度(糖の吸収)を示している。本発明の複合体中の卵白リゾチームの溶出位置は卵白リゾチーム単独の溶出位置より高分子側に移り、又、その位置がグアーガム酵素加水分解物の溶出位置とほぼ一致した。これらの事から卵白リゾチーム・グアーガム酵素加水分解物が形成されている事を確認した。

【0017】図1の矢印で示した範囲の画分が本発明の卵白リゾチーム・グアーガム酵素加水分解物複合体を含む活性画分であり、この画分を脱イオン水に対して透析後凍結乾燥した物は本発明複合体として好適に利用することが出来る。また、さらに複合体の生成を確認するために、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なった結果を図2に示す。複合体は60℃、湿度79%の条件下で1:1の重量比で反応させたものを用いた。

(標品a~c)電気泳動は、0.1%SDSを含む10%アクリルアミド分離ゲルと3%固定ゲルを用いてLaemmliの方法(Nature, 227, 680(1970))に準じて行なった。蛋白質試料(20μl, 0.1%)は1%SDSと1%メルカプトエタノールを含むトリス・グリシン緩衝液(pH8.8)で調整し、電気泳動は0.1%SDSを含むトリス・グリシン泳動用緩衝液を用い、10mAの一定電流で5時間行なった。ゲルはクーマシーブルーG-250とフクシンを用いて蛋白質及び糖染色を行なった。

【0018】図2より、本発明複合体は固定ゲルと分離ゲルの間の境目付近に蛋白質と糖染色の単一バンドが出ていることから、卵白リゾチームがグアーガム酵素加水分解物に共有結合していることがわかる。

【0019】

## 【実施例3】 本発明複合体の乳化特性の測定

本発明の代表的複合体2種(標品d及び標品b)と卵白リゾチームの乳化特性を測定した。乳化特性はPearceらの方法(J. Agric. Food. Chem., 26, 716-723(1978))に準じて測定した。

【0020】すなわち、油1.0mlと卵白リゾチーム・グアーガム酵素加水分解物複合体の0.1%(w/v)水溶液3.0mlをよく振盪した後12000rpm

mで室温で1分間ホモゲナイズして乳化物を得た。得られた乳化物を経時的に底から100μl取り、0.1%SDS水溶液5mlで希釈し、500nmにおける吸光度を測定した。尚、乳化直後に測定した吸光度を乳化活性とした。

【0021】図3に各試料についての経時的吸光度の測定値を示した。各試料の乳化活性は「標品b>標品d>>卵白リゾチーム」の関係を示す、本発明の複合体はいずれも卵白リゾチームに比較して著しく高い値を示した。標品bの方が標品dより乳化活性が高いことから、本発明の複合体を製造する際の反応条件として、湿度は65%より79%の方が乳化活性の高い複合体が得られることが分った。

【0022】

## 【実施例4】 本発明複合体のリゾチーム含量及び遊離アミノ基量の分析

本発明複合体(標品b)について、280nmに於ける吸光度を測定し、リゾチーム含量を求めた。次に、Haynes等の方法[Biochem. 6, 541(1967)]により遊離アミノ基を定量した。以上の結果を表2に示す。

【0023】

【表2】

表2 本発明複合体(標品b)の性状

試 料	リゾチーム含量	遊離アミノ基量
	(%)	(%)
卵白リゾチーム	100	100
標 品 b	35.7	82.1

【0024】表2の成績から、リゾチームに存在する遊離アミノ基の約20%がグアーガム酵素加水分解物と結合していることが示唆されている。

【0025】

## 【実施例5】 本発明複合体の溶菌活性の測定

本発明複合体(標品b)、本発明者等の先願発明の複合体[特願平2-3559号の実施例3、ACS Symposium Series No. 448, Microemulsions and Emulsions in Food, by the American Chemical Society(1991)]による卵白リゾチーム・デキストラン複合体]及び卵白リゾチームの3種を試料として、それぞれの溶菌活性を測定した。

【0026】溶菌活性はマイクロコッカス ルテウス菌体を用いて常法により測定した。基質のマイクロコッカス ルテウス菌体(シグマ社製)を660nmにおける吸光

度が0.8程度になるよう50mMのリン酸緩衝液(pH7.0)に懸濁させた液2-2.5mlに280nmにおける吸光度が0.04~0.1になるように同緩衝液に溶解した試料溶液0.1mlを加え、37℃で約5分間反応させ、その間経時的に660nmにおける吸光度を測定し、比例関係にある部分から1分間あたりの濁度減少率を算出し、溶菌活性とした。さらに卵白リゾチーム単独の活性を100%とし、本発明及び先願発明の複合体の相対活性を求めた結果を表3に示す。

【0027】

【表3】

表3 本発明複合体の溶菌活性

試料	溶菌活性(%)
卵白リゾチーム	100
本発明複合体	79.2
先願発明複合体 (特開平2-3559号)	32

【0028】表3の成績から本発明複合体は先願発明の複合体に比べて卵白リゾチーム本来の溶菌活性の阻害が少ないことが分った。この事実は本発明複合体を構成するリゾチームの活性部位がより多く残存していることを示唆するものである。

【0029】

【実施例6】 本発明複合体の抗菌活性の測定

本発明の複合体(標品b)及び卵白リゾチームを試料としてE. coliに対する抗菌活性を以下のようにして測定した。即ち、E. coli(IFO 12713)を表4に示す組成からなる培地で30℃、18~24時間振とう培養後、集菌して滅菌水で洗浄した。

【0030】

\*【表4】

表4 E. coli培地組成

ペプトン	10g
酵母エキス	5g
NaCl	5g
グルコース	1g
水	1000ml
	pH 7.0

10

【0031】この菌体を約 $10^5$  cells/mlになるように50mMリン酸緩衝液(pH7.0)に懸濁させ、これに最終蛋白質濃度が0.05%になるように試料を添加し、50℃で振とうしながら40分間反応させた。その間反応混合液を経時的にサンプリングし、氷冷して室温に戻し、適宜希釈してマッコンキー寒天平板培地に塗抹し、37℃で18~24時間培養し、コロニーを計測することによって各反応混合液中のE. coliの生存率を経時的に求めた。対照として、試料を添加しないで同様に処理して求めた値と併せて図4に示す。

20

【0032】図4の成績から明らかなように、卵白リゾチームが対照と殆んど差異が無く抗菌活性が認められないのに対し、本発明複合体(標品b)は50℃で10分以上処理した場合に顕著な抗菌活性を示した。さらに抗菌活性メカニズムを解明するため、反応条件を20℃、1時間及び50℃、30分に変更した以外は上述の抗菌活性測定の場合と全く同様にして、E. coli懸濁液に所定の試料を添加して反応させた後12000rpmで10分間遠心分離して反応混液から菌体を除去し、上清の200~300nmに於ける吸光度を測定した。この吸光度曲線は図5に示し、菌体内から溶出した核酸の量に相関する260nmに於ける吸光度は表5に示した。

【0033】

\*【表5】

表5 核酸溶出量

試料	260nmの吸光度	
	20℃、1時間処理	50℃、30分処理
卵白リゾチーム	0.710	0.948
本発明複合体 (標品b)	0.715	1.093
対照	0.049	0.422

【0034】表5から明らかなように、50℃、30分処理の場合、卵白リゾチームより本発明複合体を添加した方が260nmの吸光度が大きい値を示しており、菌

体内から溶出する核酸の量が増加した。

【0035】

【実施例7】 本発明複合体の静菌効果試験

本発明複合体（粗製物No. 5及び標品b）と卵白リゾチームのグラム陰性菌に対する静菌効果をカップ法により比較検討した。供試菌として、*E. coli* (IFO 3208) 及び *P. mirabilis* (IFO 13300) の2種のグラム陰性菌を用い、それぞれ表4に示した組成の培地で30℃、18～24時間振とう培養後、滅菌生理的食塩水に懸濁し、マッコンキー寒天平板培地にコンラージ氏棒で塗抹し風乾した。ステンレスカップ（径8mm、高さ10mm）をセットし、各試料をそれぞれ1～2%水溶液とし、滅菌濾過して100μl 10 注入した後、35℃、24時間培養した。

【0036】結果は図6-①、②に示した。中央部分のリゾチーム単独では静菌効果が認められないが、本発明複合体粗製物No. 5及びそのゲル濾過精製品の標品bではいずれも静菌効果を示すクリアゾーンが大きく静菌効果が認められ、ゲル濾過精製品の標品bは特に優れた静菌効果を示した。また、試料（標品b）を0.05%水溶液とし供試菌として *E. coli* (1FD (2713)) を用いた場合の結果を図6-③に示した。このように濃度を下げた場合も静菌効果が認められた。

【0037】

【実施例8】透析処理を施さないグアーガム酵素加水分解物を用いて実施例1及び2と同様な方法で複合体を調製した。得られた複合体はほぼ同様な溶菌活性、乳化性及び抗菌性を示した。

【0038】

【発明の効果】本発明によれば、安価な原料から複合体を得ることができ、乳化剤、抗菌剤として有利に使用できるため食品、医薬品、化粧品等の分野において多大な貢献をするものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】卵白リゾチーム-グアーガム酵素分解物複合体のゲル濾過パターンを示す図。

【図2】本発明複合体のSDS-ポリアクリルアミド電気泳動の泳動パターンを示す図。

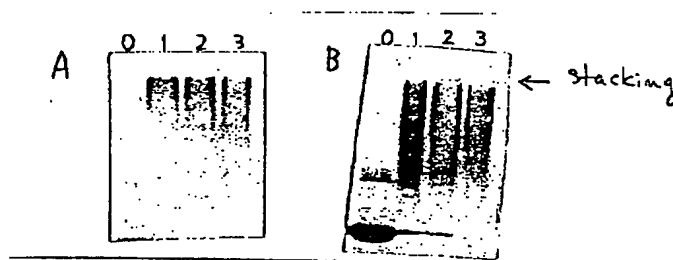
【図3】ゲル濾過によって分離精製した卵白リゾチーム-グアーガム酵素加水分解物複合体の乳化製を示す図。

【図4】本発明複合体の *E. coli* に対する抗菌効果を示す図。

【図5】本発明複合体による菌体からの溶出成分を分析するための吸光度曲線を示す図”

【図6】本発明複合体の静菌効果を示す写真。

【図2】



写真

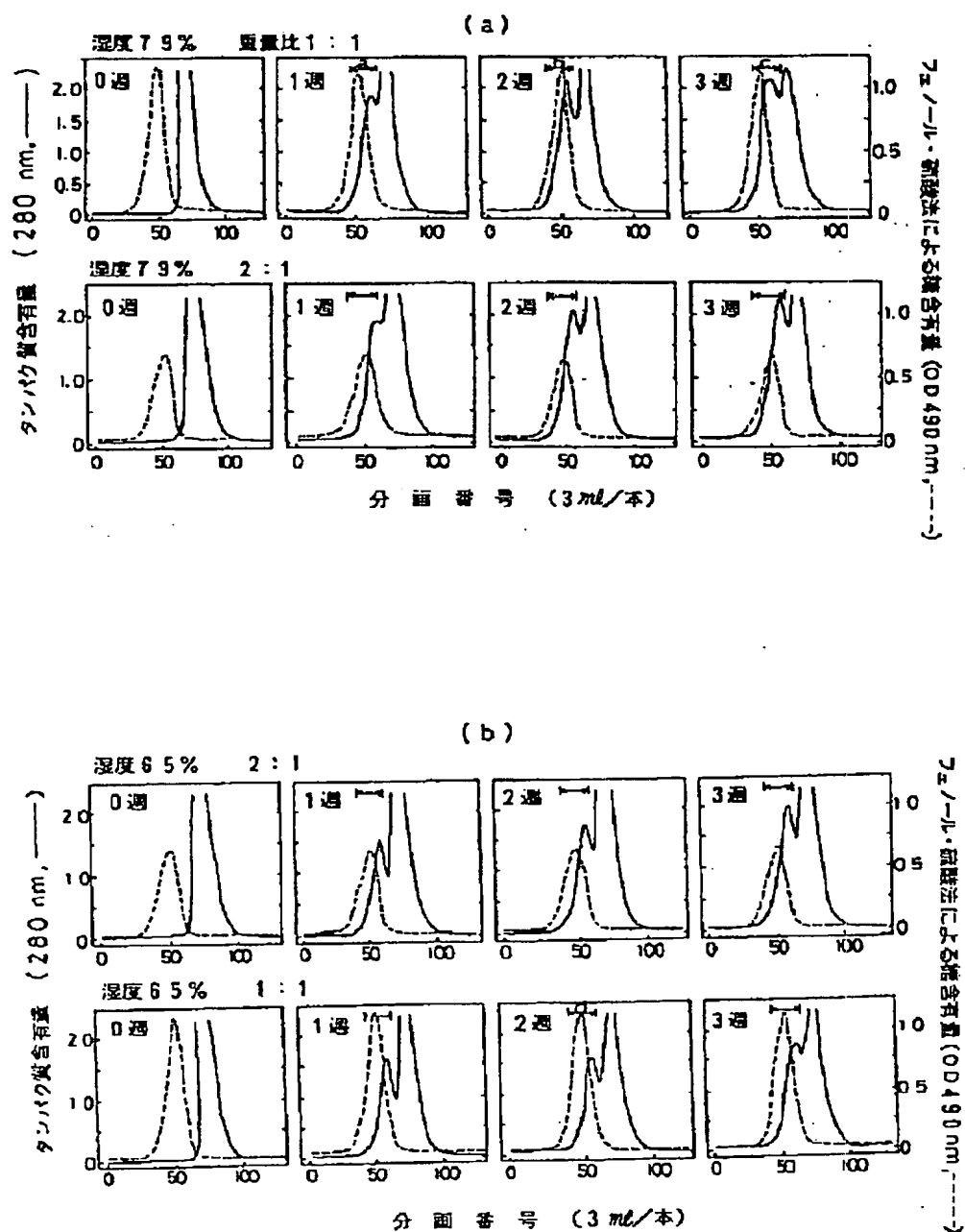
A : 糖染色

B : 蛋白染色

→は固定ゲルと分離ゲルの境界を示す

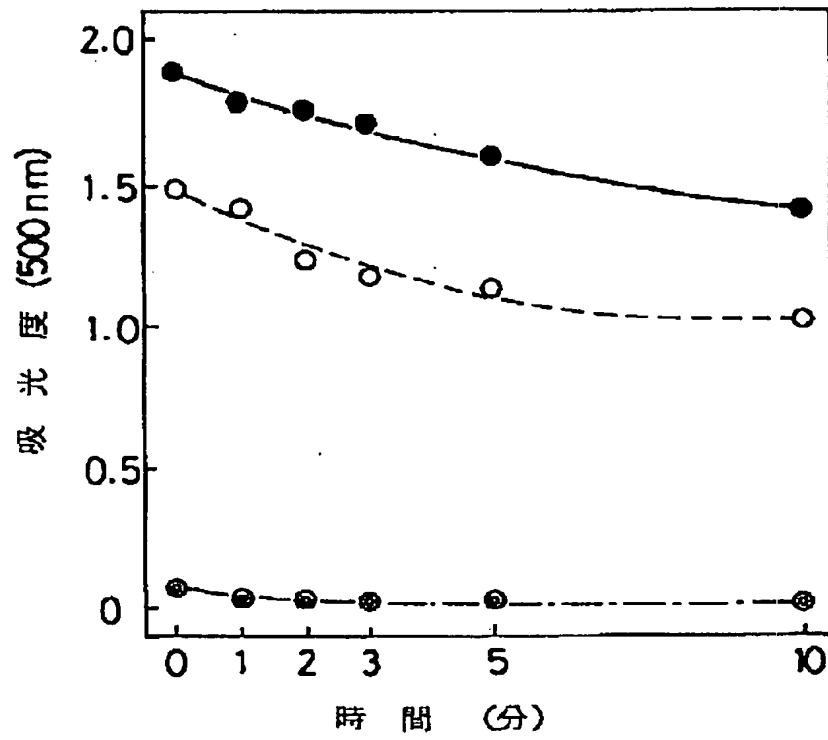
- |   |             |
|---|-------------|
| 0 | 未処理         |
| 1 | 1週間反応（第1図a） |
| 2 | 2週間反応（第1図b） |
| 3 | 3週間反応（第1図c） |

【図1】





【図3】

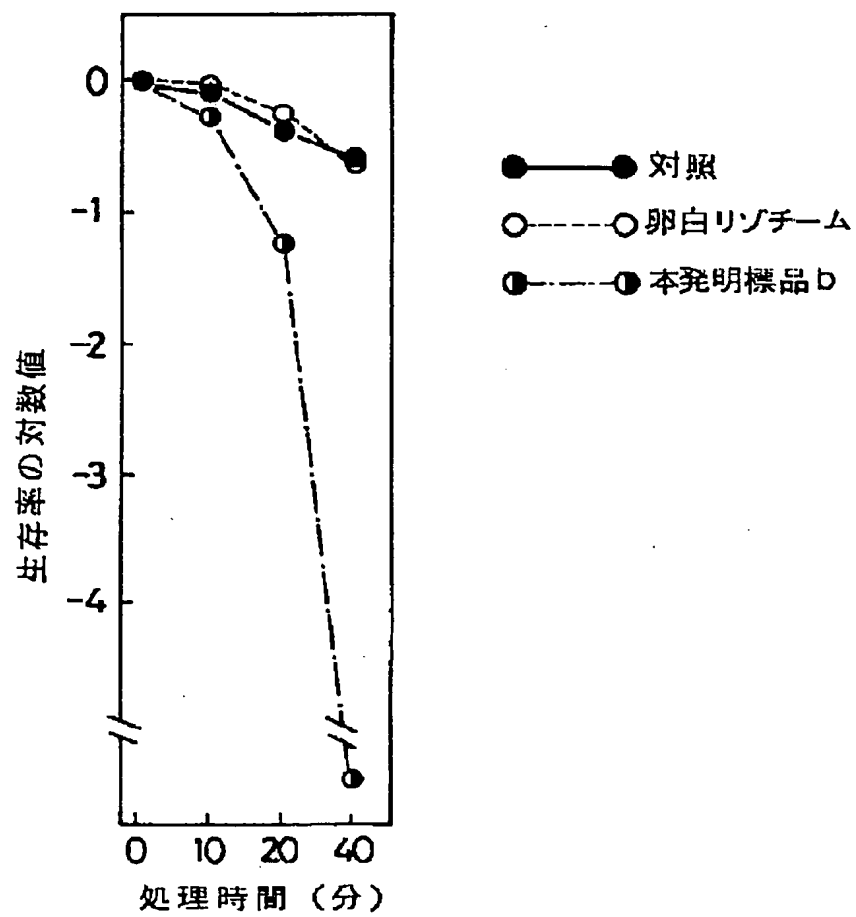


⊙ 卵白リゾチーム単独

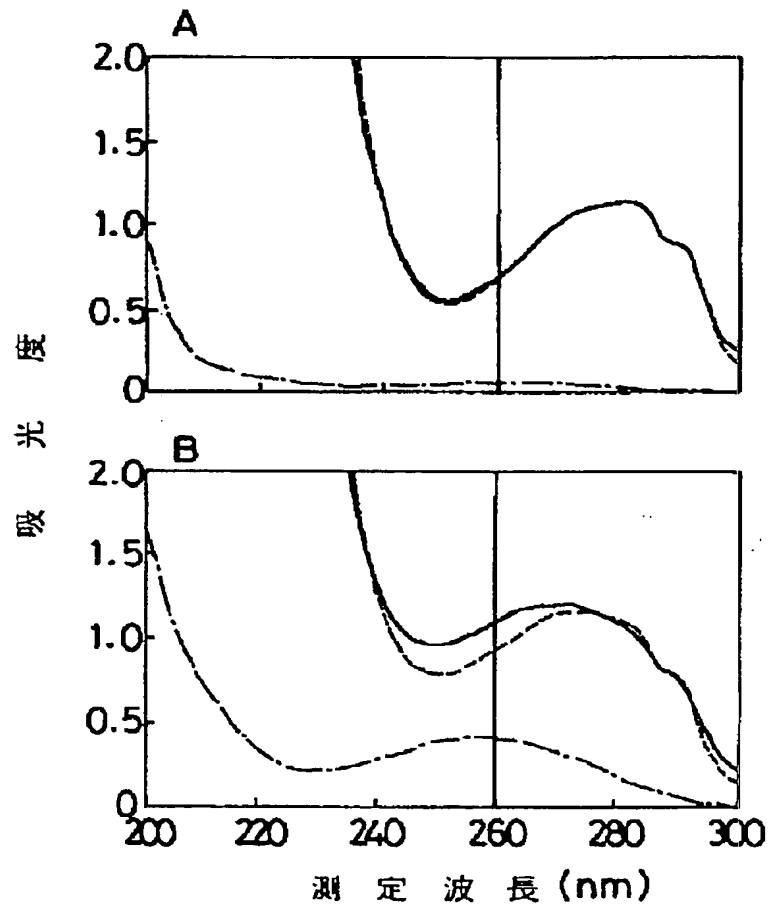
○ 湿度65%で60°C 2週間反応 (第1図d)

● 湿度79%で60°C 2週間反応 ( " b)

【図4】



【図5】



A: 20°C, 1時間処理

B: 50°C, 30分処理

--- 対照

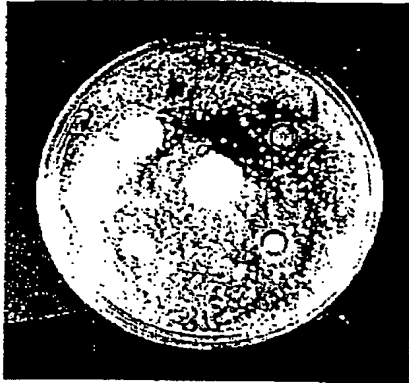
..... 卵白リゾチーム

— 本発明複合体 (標品b)

【図6】

①

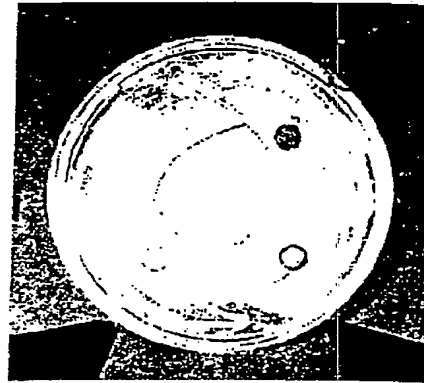
E. coli IFO 3208



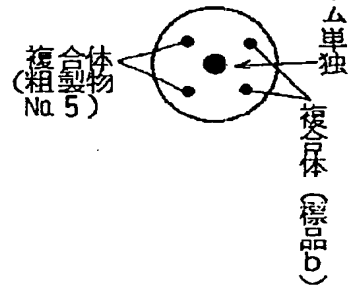
写真

②

P. mirabilis IFO13300

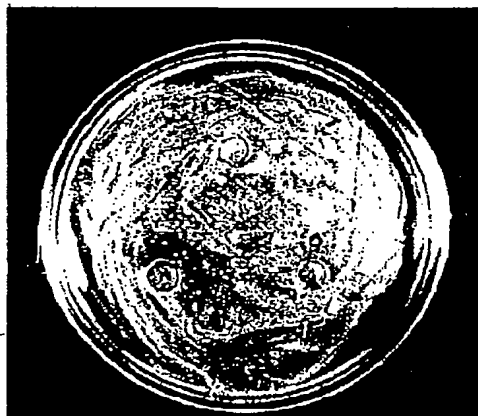


写真



③

E. coli IFO 12713



写真

